

Best Available Copy

PCT/KR 2004 / 0 0 2 9 9 1

RO/KR 2 6. 1 1. 2004



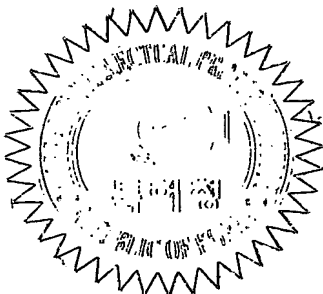
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0090204
Application Number

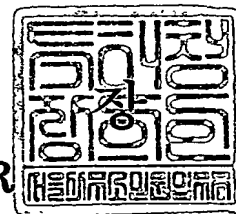
출원 년 월 일 : 2003년 12월 11일
Date of Application DEC 11, 2003

출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.



2004 년 11 월 23 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.12.11
【발명의 명칭】 고농도 고수율의 젖산을 생산하는 젖산균과 이를 이용한 젖산 생산방법
【발명의 영문명칭】 Method for producing lactic acid with high concentration and high yield using lactic acid bacteria
【출원인】
 【명칭】 씨제이 주식회사
 【출원인코드】 1-1998-003466-9
【대리인】
 【성명】 이덕록
 【대리인코드】 9-1998-000461-7
 【포괄위임등록번호】 1999-001584-7
【발명자】
 【성명의 국문표기】 박영훈
 【성명의 영문표기】 PARK, Young Hoon
 【주민등록번호】 511229-1010425
 【우편번호】 463-703
 【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개대림아파트 111동 102호
 【국적】 KR
【발명자】
 【성명의 국문표기】 조광명
 【성명의 영문표기】 CHO, Kwang Myung
 【주민등록번호】 690823-1345331
 【우편번호】 467-866
 【주소】 경기도 이천시 부발읍 아미리 753 현대아파트 707-1603
 【국적】 KR
【발명자】
 【성명의 국문표기】 김혜원
 【성명의 영문표기】 KIM, Hye Won
 【주민등록번호】 691228-2057419

【우편번호】 463-906
【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 한신아파트 209-809
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김대철
【성명의 영문표기】 KIM,Dae Cheol
【주민등록번호】 680702-1094222
【우편번호】 442-747
【주소】 경기도 수원시 팔달구 영통동 1054-3 황골마을신명아파트 201동 302 호
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 사단법인 한국종균협회
【수탁번호】 KCCM-10542
【수탁일자】 2003.12.04
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】
【기본출원료】 11 면 29,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 4 항 237,000 원
【합계】 266,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 김치에서 분리한 신규 젖산균 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310(*Lactobacillus paracasei* CJLA0310) KCCM-10542의 동정 및 이 균주를 이용하여 고농도 및 고수율의 젖산을 생산하는 방법을 제공한다. 젖산은 식품 보존제, 향취제 또는 산미제 등의 식품 첨가제로 사용될 뿐만 아니라 화장품, 화학, 금속, 전자, 직물, 염색, 제약 등에 광범위하게 이용되며, 특히 석유 유래의 플라스틱을 대체함으로써 난분해성 폐기물의 축적을 근원적으로 제어할 수 있는 생분해성 플라스틱의 일종인 폴리락틱엑시드(PLA, poly lactic acid) 제조의 원료물질로도 사용되는 산업적으로 매우 유용한 유기산이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

락토바실러스, 파라카제이, 젖산, 고순도, 고수율

【명세서】

【발명의 명칭】

고농도 고수율의 젖산을 생산하는 젖산균과 이를 이용한 젖산 생산방법 {Method for producing lactic acid with high concentration and high yield using lactic acid bacteria}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 포도당 180g/L와 효모추출물 15g/L과 펩톤 10g/L 로 구성된 배양액을 이용하여 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310를 이용한 젖산 발효에서 발효시간에 따른 세포농도, 포도당농도, 젖산농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 포도당 180g/L와 펩톤 7g/L과 CSP 15g/L 로 구성된 배양액을 이용하여 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310를 이용한 젖산 발효에서 발효시간에 따른 세포농도, 포도당농도, 젖산농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 본 발명은 신규 젖산균의 분리동정과 이 균주를 이용하여 젖산을 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 김치로부터 젖산생산성이 우수한 신규 젖산균 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310(*Lactobacillus paracasei* CJLA0310) KCCM-10542을 순수 분리동정하고 이 균주를 이용하여 고농도 고수율의 젖산을 발효 생산하는 방법에 관한 것이다.

- <4> 젖산은 일반적으로 식품 보존제, 향취제 또는 산미제 등의 식품 첨가제로 사용될 뿐만 아니라 화장품, 화학, 금속, 전자, 직물, 염색, 제약 등 산업적으로 광범위하게 이용되는 중요한 유기산이다. 뿐만 아니라 젖산은 생분해성 플라스틱의 일종인 폴리락티익시드의 원료물질로도 사용되는데, 근래에 들어서는 유가상승, 원유의 고갈, 석유유래 플라스틱 제품의 부패하지 않는 특성으로 인해 야기되는 환경오염 문제로 인한 난분해성 플라스틱의 환경친화적인 대체 고분자 물질에 대한 관심이 증가되고 있어서 이에 따른 젖산의 수요가 크게 증가하는 추세이다. 세계적인 젖산시장의 규모는 2000년 기준 연간 약 10만 톤 정도이며, 연간 약 5%의 성장을 하고 있으며, 생분해성 플라스틱의 수요가 점차적으로 증가하고 있음을 감안할 때 향후 수 년 이내에 젖산의 수요는 더욱 증가할 것으로 예상된다. 특히 젖산은 수산기와 카르복실기를 가지고 있어 반응성이 큰 유기산으로서, 폴리락티익시드 뿐만 아니라 아세트알데히드(acetaldehyde), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), 아크릴산(acrylic acid), 2,3-펜타디온(2,3-pentathione) 등의 화학물을 생산하는 중요한 원료물질로도 사용된다. 젖산은 또한, 생분해성이며 무독성 용제인 에틸락테이트(ethyl lactate)의 제조에도 사용되며, 이는 전자제조업, 페인트나 직물, 세제, 접착제나 인쇄물등에 이용되고 있다.
- <5> 이와 같이 젖산은 산업적으로 유용성이 매우 큰 물질이며, 젖산을 생산하는 방법으로는 전통적인 화학합성법과 탄수화물을 기질로 하는 생물학적 발효법이 있

다. 상업적으로는 후자의 방법이 선호되어지는데, 그 이유는 화학합성법을 이용해 젖산을 제조하는 경우 유가상승에 의한 원가상승 측면이나 환경오염 측면의 문제점 외에도 디(D)형 젖산과 엘(L)형 젖산이 50%씩 섞여있는 라세믹(racemic) 혼합물 형태의 비활성인 디엘(D, L) 젖산이 생성된다는 단점 때문이다. 이때에 디(D)형과 엘(L)형 젖산의 혼합물 조성비는 조절이 불가능하며, 라세믹 혼합물 형태의 젖산을 원료로 폴리락틱엑시드를 제조할 경우 용융점이 낮은 무정형의 고분자가 되어 용도 개발시에도 제한이 많다. 반면에 미생물을 이용한 생물학적 발효법의 경우 사용하는 균주에 따라서 디(D)형 또는 엘(L)형의 젖산만을 선택적으로 생산하는 것이 가능하다. 예를 들면, 락토바실러스형(*Lactobacillus*), 바실러스형(*Bacillus*), 리조푸스형(), 스트렙토코코스형(*Streptococcus*), 엔테로코코스형(*Enterococcus*)의 미생물은 엘(L)형 젖산을 주로 생산하며, 류코노스톡형(*Leuconostoc*)과 락토바실러스 불가리쿠스() 미생물은 디(D)형 젖산을 주로 생산하는 것으로 알려져 있다. 화장품이나 식품산업에서는 엘(L)형의 젖산을 선호하는데 이는 디(D)형의 젖산이 체내에서 대사되지 않는다는 문제가 있기 때문이다. 또한, 광학적으로 순수한 엘(L)형 젖산을 원료로 사용하여 폴리락틱엑시드를 제조할 경우 180℃의 높은 용융점을 가지는 크리스탈의 형태로 제조가 가능하며, 중합시에 소량으로 첨가하는 디(D)형 젖산의 비율을 조절함으로써 폴리락틱엑시드의 물성 조절이 가능하며 다양한 종류의 플라스틱 대체용도로의 개발이 가능하다.

- <6> 이와 같이 젖산이 기존의 다양한 산업적 용도 뿐만 아니라 환경 친화적 대체 소재로서 커다란 잠재시장을 가지고 있는 현 시점에서 생물학적 발효법에 의해 경제적으로 젖산을 생산하는 방법의 개발은 매우 중요하며, 이를 위하여는 우수한 젖산 생산균주의 개발과 경제성있는 젖산 발효법의 개발이 선행되어야 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <7> 본 발명의 목적은 산업적으로 유용한 젖산을 생물학적 발효법에 의해 생산하기 위하여 보다 효율적으로 젖산을 생산할 수 있는 미생물을 제공하는 것이다. 더 구체적으로는 성장률과 젖산 생성능이 우수한 젖산균을 분리하여 산업적으로 유용한 고농도 고수율의 젖산 생산균주를 개발하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 생물학적 젖산 발효공정에서 젖산 수율이 높고, 발효종료시 발효액내 젖산 농도가 높고 요구되는 발효시간이 짧아서 생산성이 높을 뿐만 아니라 경제성 있는 젖산균주를 개발하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <8> 본 발명은 우수한 젖산생산능을 가지는 신규 젖산균 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310(*Lactobacillus paracasei* CJLA0310) KCCM-10542의 분리동정과 이를 이용하여 고순도의 젖산을 생산하는 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명은 김치에서 분리 동정한 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310 균주를 이용한 고농도 고수율의 젖산 발효 방법과, 이 균주를 이용하여 적절한 배양조건 하에서 L형과 D형의 젖산의 생산비를 조절하는 방법도 제공한다.
- 10> 또한, 배지 내 성분 중 산업적 생산시 제조원가 상승요인인 효모추출물을 저가의 콘 스텝 파우더(corn steep powder)로의 대체가능성을 보임으로서 젖산의 생산원가를 절감시킬 수 있는 가능성을 제시한다.
- 11> 본 발명은 아래의 실시예에서 보다 자세히 설명하나, 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 이에 국한되는 것은 아니다.

<12> 실시예 1: 젖산균의 분리 및 동정

<13> 본 발명자들은 경기도 이천에 소재하는 CJ 주식회사 이천1 김치공장의 폐김치 처리장에서 수거한 김치로부터 액즙을 분리한 후, 생리식염수(8.5g/l NaCl)로 희석하여 MRS 배지(Difco Co.)에 균일하게 도말하였다. 37℃에서 2일간 배양 후 콜로니를 순수분리하고 노란색을 띄는 콜로니를 잠정적 젖산균으로 선별하였다. 생성된 콜로니의 크기가 가장 큰 콜로니 12개를 분리하여 각각 콜로니를 MRS 액체배지에서 37℃로 2일간 배양하여 세포성장 및 젖산 생산력이 가장 우수한 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 16S rDNA의 부분염기서열(800bp)을 결정하여 11가지의 락토바실러스속 표준균주의 DNA 염기서열 데이터베이스와 비교하였다. 그 결과 표 1에서 보는 바와 같이 분리된 균주는 락토바실러스속 표준균주와 DNA 염기서열이 89%이상의 유사성을 가지고 있었다. 특히 2종의 락토바실러스 파라카세이 에스피 균주(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*와 *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*)와 100%의 유사성을 보이는 신규한 락토바실러스속 미생물로 판명되었다. 따라서 본 균주는 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2003년 12월 4일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM-10542를 부여받았다.

<14> 【표 1】

분리한 CJLA0310 균주와 락토바실러스속 표준균주와의 16s rDNA의 염기서열 유사도

균주명	유사성(%)
락토바실러스 파라카세이 에스피 파라카세이(<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130T)	100.00
락토바실러스 파라카세이 에스피 톨레란스(<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171T)	100.00
락토바실러스 제이에이(<i>Lactobacillus zeae</i> ATCC 15820T)	
락토바실러스 카세이(<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134T)	98.63
락토바실러스 람노서스(<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136T)	98.62
락토바실러스 버미폼(<i>Lactobacillus vermiforme</i> ATCC 13133)	97.87
락토바실러스 힐가르디(<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290T)	91.06
락토바실러스 콜리노이드(<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123T)	90.96
락토바실러스 파라플랜타룸(<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667T)	90.72
락토바실러스 펜토서스(<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558T)	89.99
락토바실러스 플랜타룸(<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149T)	89.86
	89.86

<15> 실시예 2: 신규 미생물의 젖산 발효 특성(포도당 180g/L + 효모추출물 15g/L + 펩톤 10g/L)

<16> 신규 젖산균 CJLA0310의 배양을 위하여 포도당 180g/L, 효모추출물 15g/L, 펩톤 10g/L으로 구성된 2.4L의 발효배지가 들어있는 발효조(5L)에 동일배지에서 18시간동안 배양한 접종균 600ml을 접종하였다. 이를 PH 6.0, 교반속도 200rpm, 37℃에서 50시간동안 배양한 결과 도 2에 나타난 것과 같이 배양 50시간 후에 포도당 180g이 소모되었고 이때 세포성장은 흡광도(O.D.600) 24이었으며 최종적으로 젖산 181g/L가 생성되었다. 따라서, 젖산수율은 99.5%이었고, 평균 시간당 부피생산성은 3.85g/L/hr이었다.

<17> 실시예 3: 신규 미생물의 젖산 발효 특성(포도당 160g/L + 효모추출물 15g/L + 펩톤 15g/L)

<18> 신규 젖산균 CJLA0310의 배양을 위하여 포도당 160g/l, 효모추출물 15g/l, 펩톤 15g/l으로 구성된 2.4L의 발효배지가 들어있는 발효조(5L)에 실시예2의 배지에서 18시간동안 배양한 접종균 600ml을 접종하였다. 이를 PH 6.0, 교반속도 200rpm, 온도는 33, 35, 37, 39, 41℃에서 각각

50시간 동안 배양하여 배양 온도변화에 따른 발효능을 확인한 결과, 표 2에서 보는 바와 같이 배양 온도에 따라 디(D), 엘(L)형의 젖산의 발효비가 조절가능함을 확인하였다.

<19> 【표 2】

배양온도 변화에 따른 디형젖산과 엘형젖산의 생산비 변화

배양온도(℃)	33	35	37	39	41
발효비(%) (디형젖산:엘형젖산)	4.0:96.0	3.5:96.5	3.3:96.7	3.1:96.9	0.7:99.3

<20> 실시예 4: 신규 미생물의 젖산발효 특성(포도당 180g/L + 펩톤 7g/L + CSP 15g/L)

<21> 신규 젖산균 CJLA0310의 배양을 위하여 포도당 180g/L, 펩톤 15g/L, CSP(corn steep powder) 15g/L 으로 구성된 2.4L의 발효배지가 들어있는 발효조(5L)에 실시예2의 배지에서 18시간동안 배양한 접종균 600ml을 접종하였다. 이를 PH 6.0, 교반속도 200rpm, 37℃에서 70시간 동안 배양한 결과 도 3에 나타난 것과 같이 배양 65시간 후에 포도당 180g이 소모되었고 이때 세포성장도(OD₆₀₀) 24이었으며 최종적으로 젖산 179.1g/L가 생성되었다. 따라서, 젖산수율은 99.5%이었고, 평균 시간당 부피생산성은 2.76g/L/hr이었다

【발명의 효과】

<22> 본 발명에 의하면, 락토바실러스 파라카세이 CJLA0310은 김치에서 분리한 젖산 생산균주로서, 적절한 배양조건 하에서 광학적으로 순수한 엘(L) 형의 젖산을 고농도와 고수율로 생산할 수 있는 특성이 있다. 본 발명은 산업적으로 유용한 유기산의 일종인 엘(L) 형 젖산의 생물학적 생산 방법을 제공하며, 또한 탄수화물 대비 젖산 생산수율과 생산성이 높은 경제적으로 젖산의

30090204

출력 일자: 2004/11/24

대량생산이 가능한 생물학적 생산방법을 제공하므로 이는 식품 및 환경 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

젖산 생성능이 우수하고 성장속도가 빠른 신킴주 락토바실러스 파라카제이 CJLA0310(*Lactobacillus paracasei* CJLA0310) KCCM-10542.

【청구항 2】

제1항의 균주를 포도당 160-180g/L, 효모추출물 15g/L, 펩톤 7-15g/L를 포함하는 배지에서 배양하여 고농도의 젖산을 생산하는 방법.

【청구항 3】

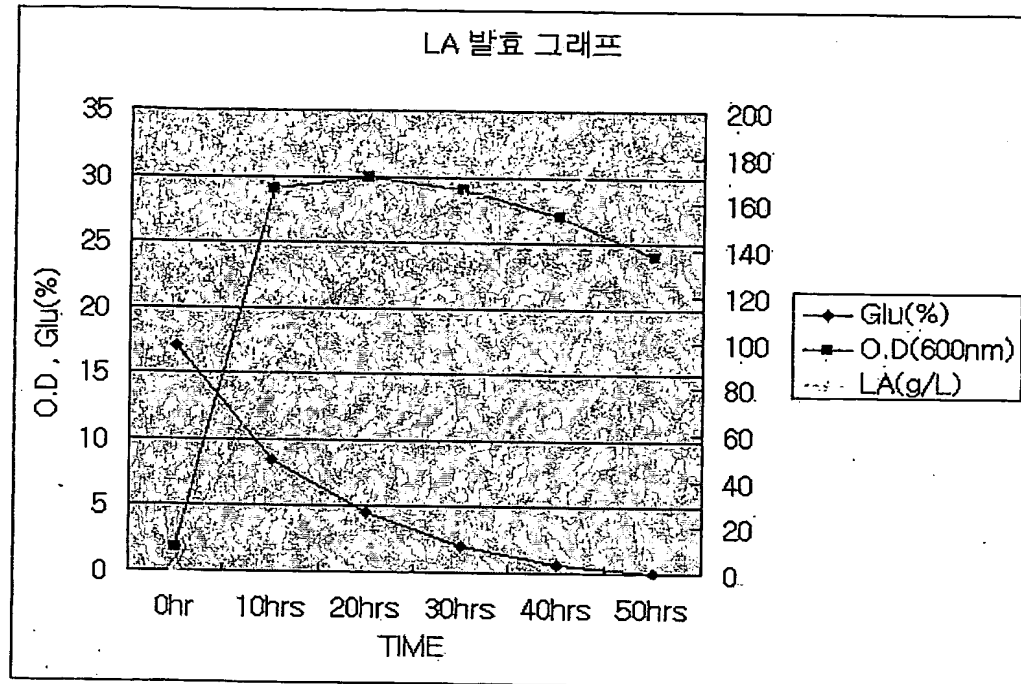
제2항에 있어서, 배양시 온도 조건을 33-41℃로 변화시킴으로써 디(D)형과 엘(L)형 젖산의 생산비를 조절하여 고농도의 젖산을 생산하는 방법.

【청구항 4】

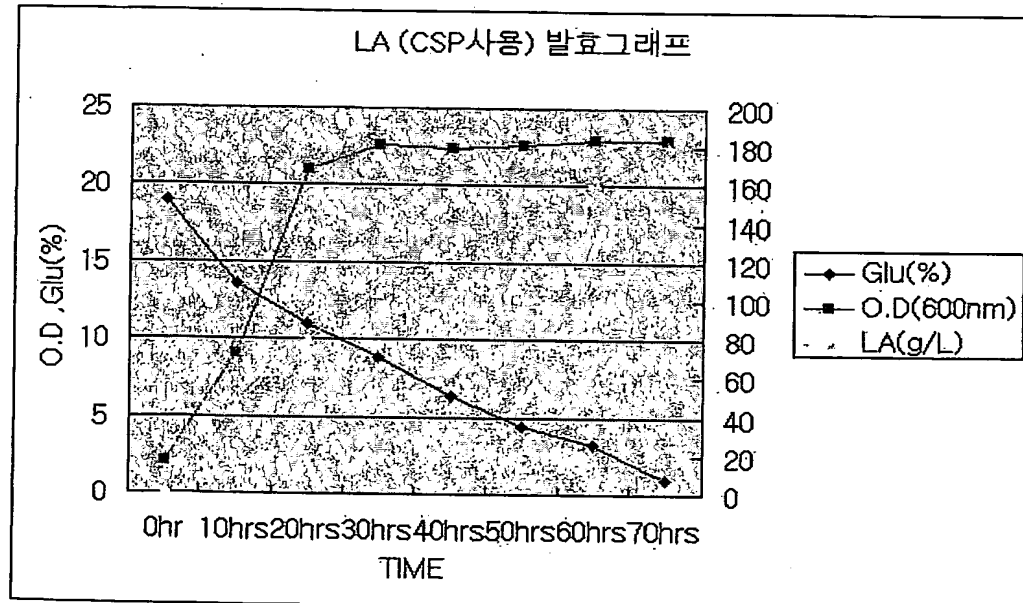
제2항에 있어서, 효모추출물 대신 콘 스티프 파우더(corn steep powder)를 포함하는 배지에서 배양하여 고농도의 젖산을 생산하는 방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002991

International filing date: 18 November 2004 (18.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0090204
Filing date: 11 December 2003 (11.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 December 2004 (16.12.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.